

Conditions expérimentales influençant la cinétique de la rénine et du substrat dans le plasma humain

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Claude de SENARCLENS

de

Genève

Thèse N° 3421

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Robert VEYRAT †
Professeur Alex-F. MULLER
Professeur Michel-B. VALLOTTON

Conditions expérimentales influençant la cinétique de la rénine et du substrat dans le plasma humain

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Claude de SENARCLENS

de

Genève

Thèse N° 3421

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Alex-F. Muller et du professeur Michel B. Vallotton, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Le doyen:
William Geisendorf

Thèse N° 3421



Ce travail a été fait dans le Laboratoire de physiopathologie clinique et dans le cadre du Département de médecine de la Faculté de médecine de l'Université de Genève. Il a été subventionné par le Fonds national suisse pour la Recherche scientifique (N° 3.7930.72).

Nous rendons hommage à feu le Professeur Robert Veyrat qui a assumé la direction de cette thèse jusqu'à son décès l'année dernière. Son attention chaleureuse et ses conseils rigoureux nous ont été précieux tout au long de sa réalisation.

Nous sommes très reconnaissants au Professeur Michel-B. Vallotton d'avoir bien voulu relire et remanier ce travail. Sans ses indications et ses critiques bienveillantes, il n'aurait pas pu voir le jour.

Enfin, notre gratitude et notre admiration vont au Professeur Alex-F. Muller, pour la qualité de son contact humain et de son enseignement, qui ont déterminé notre orientation médicale.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Introduction	7
Méthode.....	12
Schéma expérimental	13
Résultats	15
Discussion.....	26
Conclusions	28
Bibliographie.....	29

CONDITIONS EXPERIMENTALES INFLUENCANT LA CINETIQUE DE LA RENINE ET DU SUBSTRAT DANS LE PLASMA HUMAIN

Introduction

L'activité de la rénine plasmatique (ARP) telle qu'elle est dosée par les méthodes classiques, soit biologique, soit radioimmunologique, est appréciée par le taux d'angiotensine I ou II produite.

Cette hormone apparaît à la suite de deux transformations enzymatiques (*tableau 1*).

La rénine issue de l'appareil juxta-glomérulaire, agit sur un substrat protéique, l'*ANGIO-TENSINOGENE*, synthétisé par le foie. L'hydrolyse de cette globuline aboutit à l'*ANGIO-TENSINE I*, biologiquement peu active. Ce décapeptide est à son tour scindé en octapeptide actif l'*ANGIOTENSINE II*, par l'enzyme de conversion d'origine principalement extra-rénale.

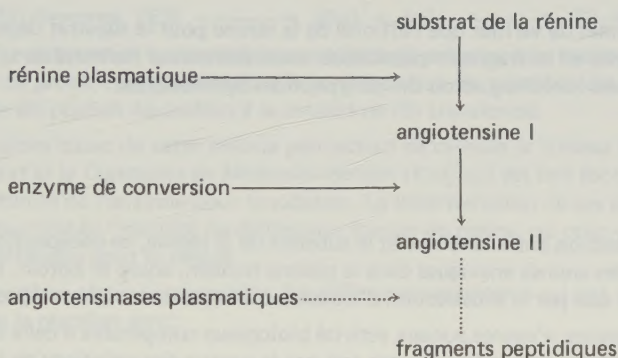


TABLEAU 1

L'Angiotensine II est la substance pressive la plus active connue dans l'organisme. Cette propriété est utilisée par la méthode de dosage biologique, qui détermine le taux de l'hormone générée par la mesure de son effet sur la tension artérielle du rat binéphrectomisé. Elle stimule en outre, la sécrétion surrénalienne d'aldostérone, participant ainsi, par la réabsorption tubulaire du sodium, au maintien d'un volume sanguin circulant efficace et via ce mécanisme, aux variations de la pression artérielle, indépendamment de son effet presseur direct sur les vaisseaux.

Depuis 1963, des méthodes de dosages plus sensibles et plus précises permettent de mieux définir le rôle de chacun des constituants du système rénine-angiotensine-aldostérone et leur implication dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle.

La rénine

Cet enzyme a un poids moléculaire estimé à 43 000 (22,30). Il est principalement synthétisé au niveau des cellules de l'appareil juxta-glomérulaire, bien que d'autres sources tissulaires soient également connues. Sa structure biochimique définitive n'est pas encore élucidée actuellement. L'identité entre rénine plasmatique et rénine rénale est généralement acceptée, bien que l'on ignore encore à laquelle des quatre formes rénales correspond la rénine plasmatique.

Substrat de la rénine ou ANGIOTENSINOGENE

Il s'agit d'une alpha-2-globuline d'un poids moléculaire de 57 000, d'origine hépatique. Skeggs et coll. (39) ont pu synthétiser le peptide aminoterminal ou tétradécapeptide correspondant au substrat de porc et montrer que la cinétique de la réaction entre la rénine et soit le tétradécapeptide soit le substrat naturel, était comparable (40).

Ce tétradécapeptide amino-terminal est retrouvé dans plusieurs formes de substrat avec comme seule modification structurale, la substitution d'un acide aminé en position 5, variant selon l'espèce.

Ce fait permet de vérifier que l'affinité de la rénine pour le substrat dépend essentiellement de l'intégrité de ce fragment peptidique, expliquant ainsi l'affinité de la rénine humaine pour des substrats hétérologues ou des polypeptides synthétiques.

Angiotensine I

Produit de la réaction entre la rénine et le substrat de la rénine, ce décapeptide présente une séquence d'acides aminés analogues dans le plasma humain, équin et porcin. Il ne diffère dans le plasma bovin que par la substitution d'isoleucine à la place de valine en position 5.

Cette substance n'exerce aucune activité biologique comparable à celle de l'angiotensine II, susceptible d'être saisie indirectement soit par la mesure des variations de la TAH, soit par le dosage de l'aldostérone. Il a fallu attendre la mise au point de la technique radioimmunologique pour le dosage de l'angiotensine I, pour mieux définir "l'activité de la rénine plasmatique", appréciée par les taux de substrat transformés en Angiotensine I.

La compréhension de cette première étape aboutissant à l'angiotensine I a ouvert un grand champ de recherches, surtout depuis qu'il est admis qu'aussi bien la concentration du substrat que celle de la rénine, peuvent présenter des variations dans le temps et d'un individu à l'autre. Seule la détermination de ces trois paramètres fournit une analyse rigoureuse du système.

Angiotensine II

L'Angiotensine I sert à son tour de substrat à l'enzyme de conversion et est transformé en Angiotensine II en perdant un dipeptide terminal histidyl-leucine.

Le mécanisme de cette transformation n'est pas analogue au modèle de la réaction précédente. La conversion d'angiotensine I en angiotensine II est trop brève pour n'être attribuée qu'à l'enzyme de conversion circulant, dont les taux sont extrêmement faibles. Depuis les travaux de Ng et Vane (27), de Biron et coll. (1) et Oparil et coll. (29) et ceux de Sanders et

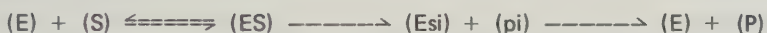
Higgins (37), il est bien démontré qu'un simple passage par la circulation pulmonaire peut accomplir cette hydrolyse et que l'enzyme de conversion est retrouvé principalement dans les fractions mitochondriale et lysosomiale du tissu pulmonaire et par conséquent, que la transformation du décapeptide en octapeptide s'opère surtout au niveau du lit capillaire pulmonaire.

Cette description permet de comprendre que le dosage de l'ARP par la méthode biologique demeure une appréciation globale de la réaction rénine-substrat-angiotensine I-angiotensine II et que seule une *étude cinétique* offre le moyen de caractériser le comportement de chacun des constituants, durant la réaction.

Par définition, dans une réaction de ce type, l'enzyme (E) se combine au substrat (S) pour former un complexe (ES) réversible. Le substrat est alors transformé en produit (P) de manière irréversible.

La *vitesse de réaction* se mesure par le dosage du produit, l'angiotensine, apparue sous l'action de la rénine, ou du substrat disparu par unité de temps.

Selon la théorie de Michaelis-Menten, à l'état d'équilibre, c'est-à-dire au moment où il y a égalité entre la vitesse de formation du complexe (ES) et la vitesse de sa disparition, la réaction peut s'écrire:



E = enzyme, S = substrat, si = quantité intermédiaire de substrat non hydrolysé, pi = quantité intermédiaire du produit correspondant à la concentration du substrat déjà hydrolysé et (P) = quantité totale du produit équivalent à la totalité de (S) transformé.

Les équations issues de cette théorie permettent de calculer la Vitesse maximum de la réaction (Vmax) et la Constante de Michaelis-Menten (Km) qui est une fonction inverse de la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat. La détermination de ces paramètres est indispensable pour établir l'identité de différentes formes de rénine, ou pour comparer l'affinité de substrats différents pour la rénine.

Pour le système rénine-angiotensine, les différents paramètres qui ont une influence sur la cinétique de la réaction sont:

1) La quantité de rénine:

Les conditions expérimentales, qui doivent s'adapter à la sensibilité de la méthode de dosage, doivent être telles que la vitesse initiale de la réaction puisse être mesurée. En effet, au-delà d'une certaine limite de temps, la production d'angiotensine diminue par épuisement du substrat présent. De plus, la prolongation d'une incubation à 37° présente le risque d'une contamination bactérienne.

Il est également bien entendu que *in vitro*, toute altération de la configuration de l'enzyme lui-même, modifie son affinité avec le substrat, indépendamment de sa concentration.

Hors des situations d'altération de l'enzyme et pour autant que le substrat demeure en excès permanent, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de l'enzyme présent dans le plasma.

L'objet de ce travail étant l'étude du rôle du substrat sur la cinétique de cette réaction enzymatique, toutes les expériences ont été pratiquées en présence d'un excès permanent de rénine exogène. L'importance de cet apport permet de réduire l'influence de la rénine endogène présente dans notre plasma de référence.

2) La concentration de substrat:

Elle est mesurée par la production maximale d'angiotensine générée au cours de la réaction, *in*

vitro. Contrairement à celle qui existe avec la rénine, la relation entre la vitesse de réaction et la concentration du substrat n'est linéaire que jusqu'à une concentration donnée de substrat (*zone cinétique d'ordre premier*) puis la courbe de la vitesse s'infléchit asymptotiquement vers un plateau et tend alors vers une vitesse maximum, constante et indépendante de la concentration de substrat (*zone cinétique d'ordre zéro*). Par définition on désigne par K_m (Constante de Michaelis-Menten) la concentration de substrat correspondant à la moitié de la vitesse maximale.

Nous avons précisément choisi de vérifier l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse de la réaction rénine-angiotensine I-angiotensine II :

A) Dans la zone de la courbe où, en principe, la vitesse varie proportionnellement avec la concentration du substrat (zone initiale et intermédiaire) et dans la zone où la vitesse est maximale et constante.

B) et d'observer si la *concentration totale* du substrat calculée après prolongation du temps d'incubation jusqu'à épuisement du substrat donnait bien les valeurs attendues. La quantité d'angiotensine produite est alors équivalente à la quantité de substrat présente dans le plasma testé.

3) La température:

Toute élévation de température augmente le mouvement des molécules et en conséquence la vitesse des réactions chimiques. En général, la vitesse de la réaction double pour une élévation de température de 10° . Mais les enzymes étant des protéines, elles sont dénaturées par les températures relativement élevées. La température optimum est un compromis entre ces deux facteurs. Sa valeur précise dépend de la vitesse de dénaturation de l'enzyme, elle-même influencée par le pH: (14, 34, 38, 44)

Pour le système rénine-angiotensine, la dénaturation de l'enzyme apparaît à une température supérieure à 55° , en présence du substrat humain. (44). La température généralement adoptée est 37° puisqu'elle est la température physiologique de la réaction *in vivo*.

4) Le pH:

Les réactions enzymatiques sont généralement très sensibles au pH du milieu. Ceci tient à trois raisons:

- les pH extrêmes modifient irréversiblement la structure active de l'enzyme, en dénaturant la protéine.
- Le pH modifie l'ionisation du substrat dans grand nombre de cas.
- Le pH a une action sur la réaction enzyme-substrat, en particulier en modifiant l'ionisation des groupements chimiques participant au site actif.

On définit un pH optimum pour chaque enzyme agissant sur un substrat donné et dans des conditions expérimentales définies. Le pH optimum de la rénine humaine sur le substrat homologue a été trouvé entre 5,5 et 6. Ce pH optimum a été choisi pour la mesure de l'ARP car il offre l'avantage supplémentaire, qu'à cette valeur les angiotensinases sont partiellement inhibées. D'autres auteurs, toutefois, ont choisi de préférence le pH physiologique de 7,4. (2, 8, 20, 33, 36).

5) La force ionique et la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs modifient également la vitesse de la réaction.

Des résultats différents en ce qui concerne le contenu en substrat dans le plasma (humain et d'autres espèces) et la Constante de Michaelis-Menten ont fait tirer des conclusions

contradictoires quant à l'ordre de la réaction *in vivo* ou *in vitro*. La plupart des inhibiteurs, qui jouent un rôle important dans le contrôle des phénomènes biologiques, se combinent de manière réversible au site actif de l'enzyme sans être ensuite décomposés par l'enzyme. L'action des inhibiteurs peut donc être persistante. Le terme *inhibiteur compétitif* signifie que l'action inhibitrice peut être complètement surmontée par l'augmentation de la concentration du substrat. Plusieurs inhibiteurs exogènes sont connus, par exemple des peptides synthétiques dont la séquence des acides aminés terminaux est proche de celle du substrat naturel. (7, 19, 32)

Malgré les variations de la concentration du substrat dans les conditions *physiologiques*, la présence d'un inhibiteur compétitif paraissait peu probable, jusqu'à la découverte par Bumpus et son groupe (5) d'un lysophosphatide isolé à partir du rein de porc et du chien et également présent dans le plasma et les érythrocytes humains. Son action inhibitrice s'exerce aussi bien *in vivo* et *in vitro* chez le rat. De nombreux travaux sont en cours pour élucider son rôle physiologique chez l'homme. De même pour les prostaglandines dont l'action inhibitrice n'est pas encore éclaircie.(23). En revanche, aucun activateur de la rénine n'est connu jusqu'à présent.

Méthode

1) Préparation de l'extrait brut de rénine humaine

Les extraits ont été préparés à partir de reins de sujets ayant présenté une HTA réno-vasculaire ou une HTA maligne.

Suivant la première étape de la méthode décrite par Haas (16) le rein est finement coupé et broyé à 4°, en présence de sable et d'une solution physiologique de NaCl 0,9% (100 ml pour 25 g de rein humain). Le tout est gelé, et décongelé puis centrifugé cinq fois. Le surnageant est conservé en aliquots à -20°.

2) Pool de plasma humain (substrat humain)

Pool de plasma humain de 1740 ml (Centre de Transfusion GE) contenant 100 ml d'EDTA 38 g/l, provenant de sujets sains en régime libre. Les échantillons de plasma prélevés à partir de ce pool, soit sous forme native soit sous forme lyophilisée, ont été testés par la méthode de Boucher et coll. (2). L'ARP et le CPS (concentration plasmatique du substrat) sont identiques respectivement pour les deux formes et la méthode est reproductible durant les 6 mois d'expérience. Pour les études de concentration, nous avons utilisé le plasma lyophilisé reconstitué par adjonction de volumes d'H₂O distillée, équivalents aux volumes correspondants de plasma natif, et jamais inférieurs à 5 ml, pour des raisons liées à la précision de la méthode.

3) Activité de l'extrait de rénine humaine.

Les échantillons de plasma natif ou lyophilisé ont été incubés pendant 3 H, à un pH de 5,5 et à une température de 37°, en présence de volumes croissants d'extraits de rénine de 25 à 2000 microl. La dose d'extrait de rénine à laquelle l'angiotensine libérée atteint une valeur maximum a été multipliée par 6 pour toutes les déterminations ultérieures du substrat. La similarité des résultats avec les divers extraits de rénine et avec les échantillons de plasma sous forme native ou lyophilisée a été assurée dans toutes les expériences.

4) Activité de la rénine plasmatique

Les critères de température, de durée d'incubation et de pH respectent les conditions de la méthode de Boucher. Les dosages ont été pratiqués suivant la méthode biologique sur des rats Wistar mâles (100–110 g) binéphrectomisés et anesthésiés au Nembutal.

Schéma expérimental

a) Pour apprécier l'influence de la *température*, les incubations ont été effectuées successivement à 17, 27, 37 et 47°, en conservant 37° comme température de référence.

La température de 27° a été choisie pour les expériences sur l'influence des variations de la concentration du substrat. Cet abaissement de température offre l'avantage de ralentir la réaction et permet d'espacer les prélèvements pour obtenir une meilleure précision. La durée d'incubation a été prolongée à 240 minutes, car le temps nécessaire pour atteindre la production maximale d'angiotensine est de 180 min.

b) Toutes les mesures de la concentration du substrat ont été pratiquées à partir du *même pool de plasma* (substrat humain) et en présence du même extrait de rénine homologue, au cours des six mois d'expérience.

c) Pour éviter la méthode de dilutions successives, les différentes *concentrations de substrat* ont été établies à partir du plasma sous sa forme lyophilisée, additionné d'un volume variable d'eau distillée.

Les paramètres suivants ont été variés:

Q = quantité de plasma incubé: 452 mg de plasma lyophilisé correspondant à 5 ml de plasma natif.

V = volume incubé: 5 ml de plasma natif ou 5 ml d'eau distillée additionnée au plasma lyophilisé.

C = concentration de substrat incubé: issue de Q/V (à partir de la même source de substrat: plasma lyophilisé).

S = concentration de substrat ou quantité absolue de substrat. Elle est indépendante de C et dépendante uniquement de Q ou d'un multiple selon la quantité Q incubée. Elle est mesurée indirectement par P (production maximale d'angiotensine).

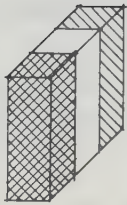
Par définition, en-dessous de la production maximale d'angiotensine II exprimée par P et correspondant à S, on a un mélange $S_i + p_i$ pour chaque concentration de substrat incubé C. p_i exprime la concentration de substrat partiellement hydrolysée à un moment donné de la réaction et le si est égal à S— p_i . Toutes les expériences de vélocité ont été exprimées pour des périodes initiale et intermédiaire par p_i par unité de temps.

En variant Q et V, la relation s'établit avec C selon le schéma suivant: (cf *tableau 2*).

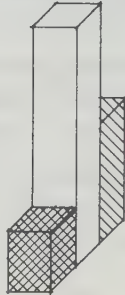
$Q = 452 \text{ mg}$; $3/2 Q = 678 \text{ mg}$; $2Q = 904 \text{ mg}$.

$V = 5 \text{ ml}$; $3/2 V = 7,5 \text{ ml}$; $2V = 10 \text{ ml}$; $3V = 15 \text{ ml}$.

SCHEMA EXPERIMENTAL (Tableau 2)



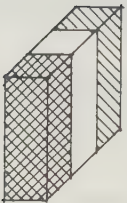
C

 $\frac{C}{2}$  $\frac{C}{3}$

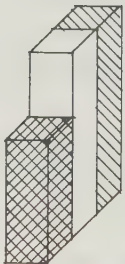
Q	V	C	S
---	---	---	---

Q	2V	$\frac{C}{2}$	S
---	----	---------------	---

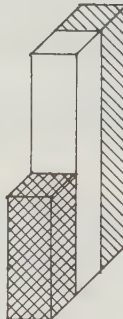
Q	3V	$\frac{C}{3}$	S
---	----	---------------	---



C



C

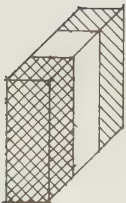


C

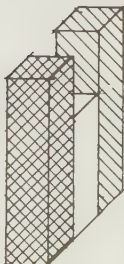
Q	V	C	S
---	---	---	---

$\frac{3}{2}Q$	$\frac{3}{2}V$	$\frac{3}{2}C$	$\frac{3}{2}S$
----------------	----------------	----------------	----------------

2Q	2V	C	2S
----	----	---	----



C

 $\frac{3}{2}C$ 

2C

Q	V	C	S
---	---	---	---

$\frac{3}{2}Q$	V	$\frac{3}{2}C$	$\frac{3}{2}S$
----------------	---	----------------	----------------

2Q	V	2C	2S
----	---	----	----

Résultats

Activité de l'extrait brut de rénine humaine (Fig. 3)

En maintenant la durée d'incubation constante (3H) et le volume de plasma également constant (5 ml) et en modifiant la quantité d'extrait de rénine exogène de 0 à 2000 microl., on observe qu'à partir de 150 microl. la production d'angiotensine demeure inchangée et correspond à la concentration plasmatique du substrat (CPS). On note également que pour 100 microl., 50 % de la quantité totale du substrat est transformée.

Nous avons donc choisi un apport exogène d'extrait de rénine de 1000 microl., soit près de 6 fois la dose correspondant au point d'inflexion de la courbe.

Stabilité des valeurs de l'ARP et de la CPS du pool de plasma: (Fig. 4)

Dans 26 échantillons de plasma incubés dans les mêmes conditions au cours des 6 mois d'expérience, l'ARP moyenne est de $17,85 \pm 4$ ng/l/min (SD). Dans la même période, la CPS dans 36 échantillons est de 432 ng/ml $\pm 23,5$ (SD).

Au cours de la même expérience, les déterminations faites en quadruplés varient fort peu (coefficient de variation de 2,8 %) sauf pour le temps zéro où les valeurs sont très basses (coefficient de variation de 57,73 %).

Influence de la température sur la vitesse de la production d'angiotensine

A un pH constant (5,5), avec le schéma expérimental pré-cité et pour des durées d'incubation variant de 5 à 300 minutes, les variations de la température affectent la vitesse de la réaction. Ceci peut être exprimé graphiquement de deux manières:

a) A chaque température (17, 27, 37 et 47°) les mêmes valeurs maximales d'angiotensine produite, équivalentes à la CPS, sont atteintes à des temps significativement différents. (Fig. 5) Après 10 min à 47°, 60 min à 37°, 120 min à 27° et 300 min à 17°.

b) Dans l'intervalle de 0 à 120 min, les pentes des droites de régression obtenues pour les valeurs d'angiotensine produite, sont différentes pour chaque température. (Fig. 6).

Pentes: 8.67 pour 17°; 21.94 pour 27°; 31.03 pour 37° et 163.8 pour 47°.

Nous avons choisi d'exprimer la vitesse de la réaction par le temps absolu nécessaire pour atteindre la moitié de la concentration plasmatique du substrat, soit un taux d'angiotensine produite de 212,5 ng/ml, et par le pourcentage d'activité par rapport à la vitesse maximum à 47°.

Les résultats confirment que la vitesse de la réaction n'est pas une fonction linéaire de l'élévation de température, surtout entre 37 et 47°, où le rendement augmente de près de 800 % dans notre expérience. Par contre, entre 17 et 37°, la vitesse s'accroît de 2,6x par 10°, conformément aux valeurs généralement rapportées pour d'autres enzymes (2,5 à 5,5x). Le temps nécessaire pour la consommation de la moitié du substrat est de 142 min à 17°, de 54 min à 27°, de 21 min à 37° et de 2,6 min à 47°. (Fig. 7).

Vitesse de la production d'angiotensine en fonction de la concentration du substrat:

Les échantillons de plasma lyophilisé puis reconstitués par des volumes d'eau distillée ont été incubés à 27°, à 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min et 240 min.

Les concentrations de substrats ont été préparées des deux manières suivantes:

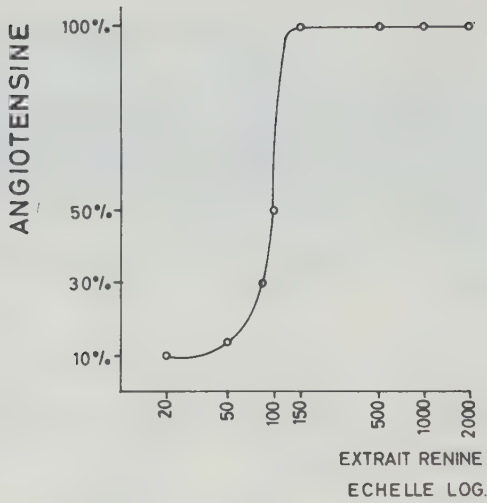


Fig. 3 — Effet de l'addition de quantités croissantes de rénine sur la génération d'angiotensine. La quantité de plasma (source d'angiotensine) et la durée d'incubation sont constantes. Les résultats sont exprimés en pour-cent du maximum d'angiotensine atteint.

CPS (ng / ml)
N=36

PRA (ng / l / min)
N=26

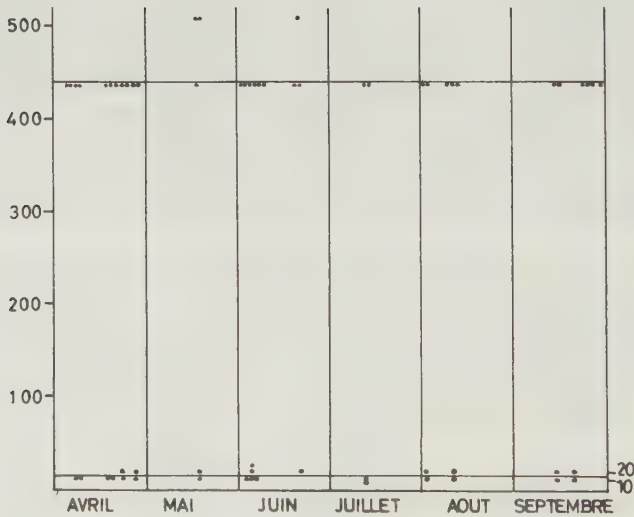


Fig. 4 — Valeurs de l'ARP et de la CPS du pool de plasma.

VELOCITE DE LA PRODUCTION D'ANGIOTENSINE
EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

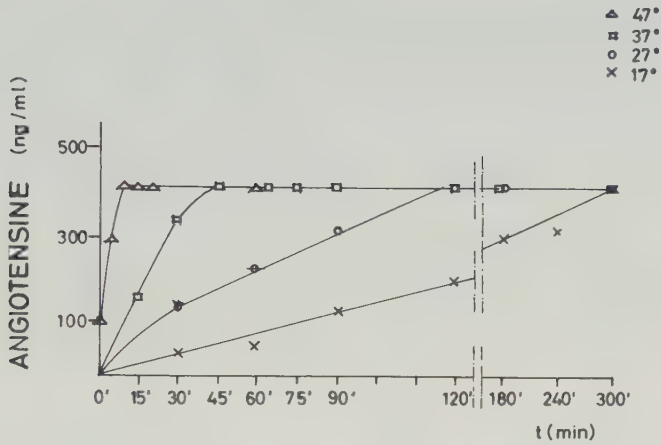


Fig. 5

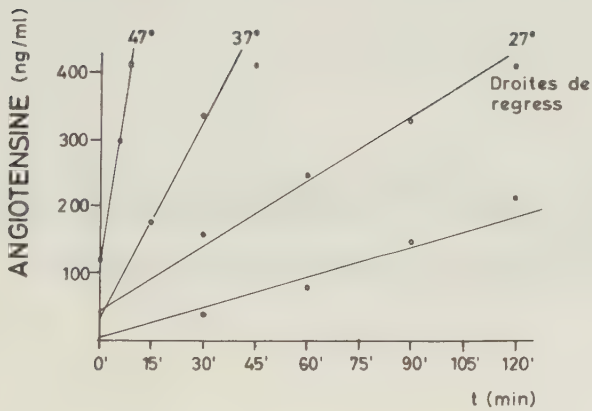


Fig. 6

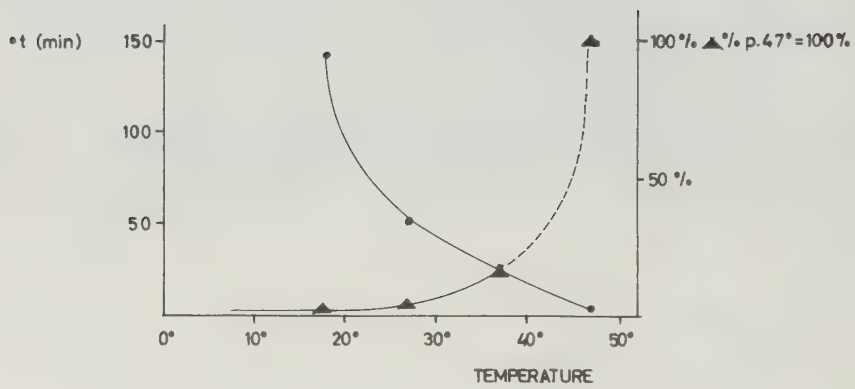


Fig. 7 — Vitesse de réaction en fonction de la température:

- ▲ en pour-cent de la génération d'angiotensine par rapport à la quantité maximum obtenue à 47°
- en temps nécessaire pour l'épuisement de la moitié du substrat.

- a) Variation de la quantité Q de substrat dans un volume fixe (5 ml)
(Q = 452 mg; $3/2$ Q = 678 mg et 2 Q = 904 mg) Fig. 8A
- b) Quantité Q fixe de substrat (452 mg) dans des volumes croissants
(V = 5 ml; 2 V = 10 ml; 3 V = 15 ml.) Fig. 8B

Les valeurs d'angiotensine produites dans ces différentes conditions permettent de confirmer la relation entre la vélocité de la réaction rénine-angiotensine et la concentration du substrat. Si on réunit sur un même graphique les résultats de ces deux expériences (8A et 8B), il apparaît à l'évidence que les vitesses initiales sont directement proportionnelles aux concentrations de substrat incubées (Fig. 9).

En prolongeant la durée d'incubation jusqu'à 240 min afin d'épuiser le substrat, on constate que la quantité totale d'angiotensine générée correspond bien à la quantité totale (Q) de substrat incubée (*tableau 8*).

En l'absence de valeurs entre 0 et 30 minutes pour chaque concentration de substrat (pour des raisons liées à la méthode), nous n'avons malheureusement pas été en mesure d'établir la K_m pour le substrat de notre pool de plasma et d'exprimer la vélocité selon l'équation dérivée de Michaelis-Menten (graphique de Lineweaver-Burke). Pour cette raison, la vélocité a été déterminée, comme pour les expériences de température, par le temps nécessaire pour la génération de 212,5 ng/ml, avec les résultats suivants:

108,8 min pour C/3; 72,8 min pour C/2 et 54 min pour C. (Fig 11).

En pourcentage de la vitesse pour 2C, la vélocité est de 19 % pour C/3; 29 % pour C/2; 40 % pour C; et 60 % pour 3/2C. Les vélocités ne sont pas strictement proportionnelles, avec un écart plus grand pour C/3 et C/2 par rapport aux valeurs théoriques (Fig. 12).

En guise de contre-épreuve, nous avons pratiqué une troisième expérience, en maintenant la concentration C constante par la variation simultanée de Q et de V. Les vitesses initiales, jusqu'à 120 minutes sont superposables. (Tableau 13, Fig. 13).

La comparaison graphique des droites expérimentales et théoriques pour chaque concentration de substrat (Fig. 12) montre un écart d'autant plus grand que les concentrations sont plus faibles (C/2 et C/3). Ce fait parlerait en faveur de la présence d'un inhibiteur endogène dont l'action serait éliminée progressivement par dilution du plasma. (Kotchen) (23).

Tableau 8

			Vélocité de la production d'angiotensine en fonction de la concentration du substrat (à 27°)						
			0min	30	60	90	120	180	240min.
Q	3V	C/3	3,5	64	106	170	281	340	425
Q	2V	C/2	4	85	212,5	255	330	425	425
Q	V	C	6	159	255	323,5	425	425	425
3/2Q	V	3/2C	5	255	340	425	637	637	
2Q	V	2C	5	340	509	637	849	849	

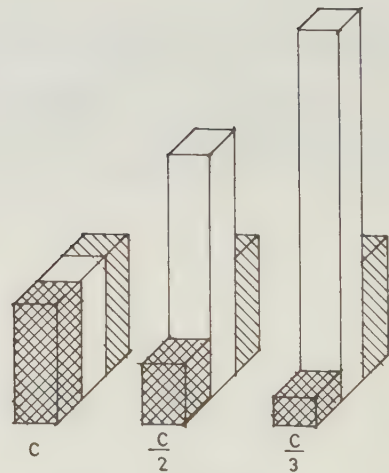
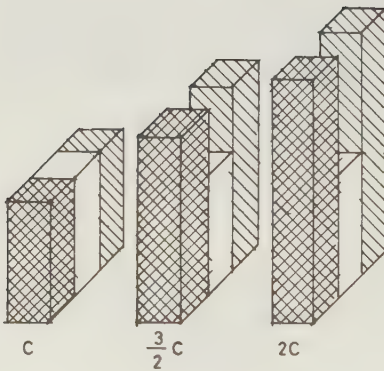


Fig. 8A

Fig. 8B

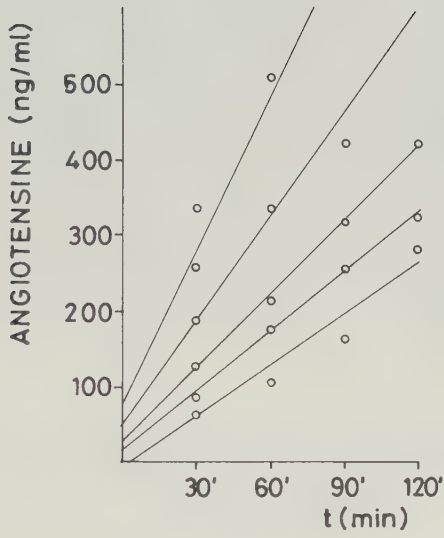


Fig. 9 — Relations entre vitesse de réaction et concentrations de substrat incubé.

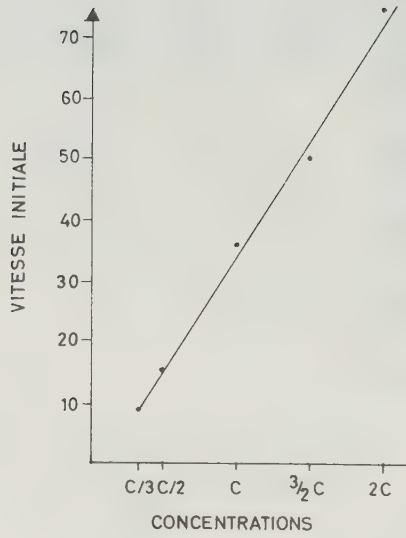


Fig. 10 — Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale.
(Valeurs tirées des pentes des droites de la fig. 9.)

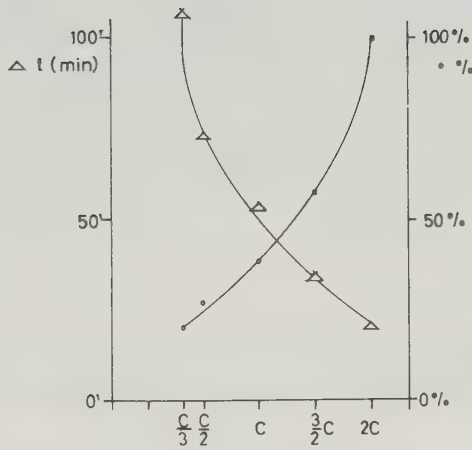


Fig. 11 — Valeurs relatives des vitesses initiales exprimées par rapport aux valeurs maximales obtenues (pour $2C$) ($\circ$) et du temps nécessaire pour la consommation de la moitié du substrat (Δ).

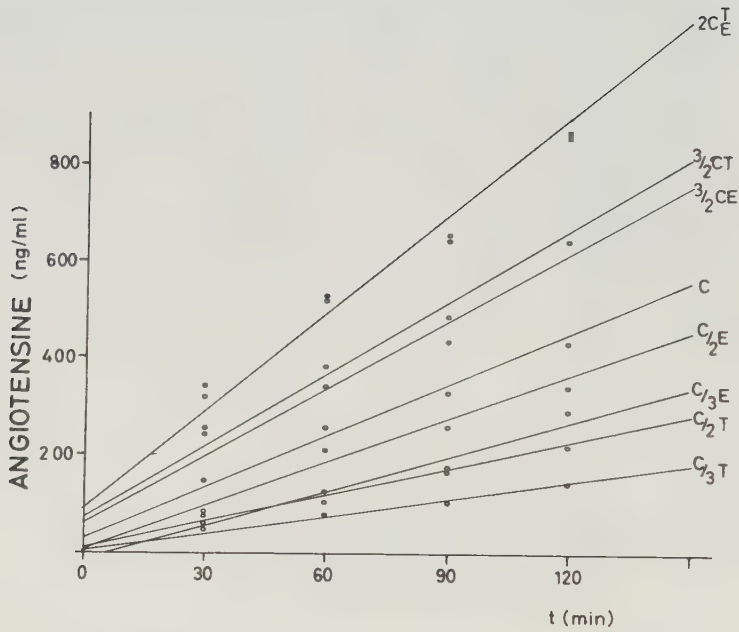


Fig. 12 — Comparaison de la génération d'angiotensine en fonction du temps, entre les valeurs expérimentales (E) et théoriques (T) lorsque la quantité C de substrat est augmentée ou diminuée.

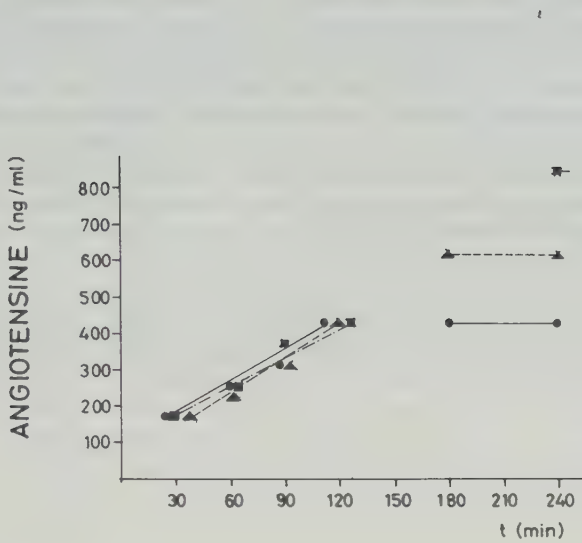
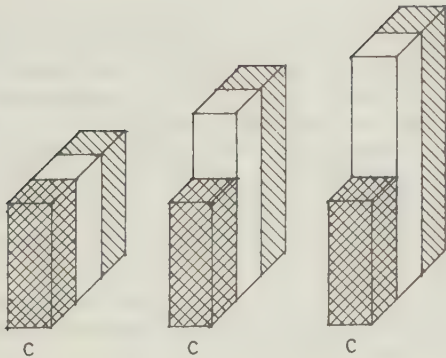


Fig. 13 — Influence du volume total du milieu, à concentration égale de substrat sur la pente initiale de la génération d'angiotensine et sur la quantité maximum.



Q	V	C	S
$\frac{3}{2}Q$	$\frac{3}{2}V$	C	$\frac{3}{2}S$
2Q	2V	C	2S

Discussion

Le terme "Activité de la rénine plasmatique" n'est pas toujours synonyme de "Activité de l'enzyme". Le premier terme fait référence à la réaction initiale aboutissant à l'angiotensine II et dépend essentiellement de la concentration de la rénine et de la concentration du substrat, ainsi que des conditions d'incubation. Le second concerne l'activité propre de l'enzyme, indépendamment de la concentration du substrat. Cette activité enzymatique peut également être modifiée par le milieu (force ionique, etc.), par le pH et par la température.

Tenant compte de ces paramètres, nous avons analysé l'influence de la température et de la concentration du substrat sur la cinétique de la réaction rénine-angiotensine I-angiotensine II après avoir établi un schéma expérimental simple et reproductible.

Un pool de plasma humain a servi de substrat à l'extrait brut de rénine homologue. L'ARP de ce pool de plasma est égale à 17 ± 4 ng/l/min, ce qui la situe à la limite supérieure de la norme pour la méthode utilisée (9 ± 7 ng/l/min). La dispersion est faible au cours des 6 mois d'expérience, attestant la faible dénaturation du plasma sous la forme lyophilisée (moins de 2 %).

Utilisée sous forme d'extrait brut, la rénine provenant de reins congelés, n'a pas été traitée (pH = 7.4) et a été conservée durant les 6 mois d'expérience sans altération notable de son activité. Elle a été additionnée en grand excès à chaque échantillon de plasma incubé pour rendre négligeable les variations de la rénine endogène, apportée par la variation des volumes de plasma ou d'équivalent lyophilisé. Aucune variation de pH n'a été constatée après son adjonction.

Il est généralement admis que la vitesse de la réaction double pour une élévation de température de 10° . Le coefficient d'activité augmente dans la zone de la température optimum propre à la rénine. Il est le plus élevé pour la rénine et le substrat de porc et le substrat humain jusqu'à une température de 48 à 56° (9), (12), (14), (34) et (44). Nos résultats sont en accord avec ces auteurs, quoi qu'un peu plus élevés. Coefficient de 2,6x entre 17 et 27° et entre 27 et 37° , alors que la norme pour le substrat humain est de 2 à 5x. Par contre ils montrent une élévation discontinue entre 37 et 47° avec un coefficient double de celui de Rosenthal et coll. (34) (près de 800 %).

Toutes les techniques de dosage de l'angiotensine générée par la réaction rénine-angiotensine II, ne s'accordent pas sur le pH optimum, suivant le type de substrat utilisé, naturel ou purifié: 5,5 (8), (12), (21), (31) et (36) avec le substrat naturel; 6 avec le substrat humain purifié (19) et (41); 7,4 (20); 7,5 (11) et (33). Toutes nos expériences ont été effectuées au pH optimum de la méthode de Boucher et coll. fixé à 5,5.

Les valeurs de la *concentration plasmatique du substrat* (CPS) sont du même ordre que celles de Poulsen et coll. (200–500 ng/ml) (33), de Rosset et coll. (35) (590 ng/ml) avec la même méthode; mais inférieures à celles de Gould et coll. (14) (700 ng/ml), de Pickens (31) (729 ng/ml), de Favre (12) (1040 ng/ml) et de Skinner (42) (1100 ng/ml). Pour expliquer la diversité frappante de ces résultats, des raisons techniques ont été évoquées; lors de la préparation du plasma avant ou après l'incubation: adsorption-élution sur résine Dowex (méthode de Boucher (2); acidification préalable du plasma avec dégradation possible du substrat (Gould (15); modification de la teneur en NaCl ou en protéines dans le milieu d'incubation (Pickens (31) et hydrolyse du substrat par une pseudo-rénine (Poulsen (32-33), Skeggs et coll. (39).

Ces différentes techniques ont en commun une modification du milieu d'incubation différent des conditions physiologiques *in vivo*. Ce fait explique en partie la disparité des valeurs de la concentration plasmatique du substrat humain endogène.

L'addition de concentrations équivalentes de rénine humaine exogène à différents plasma a montré également une variation des taux d'angiotensine générée par unité de rénine additionnée (2), (5), (10), (25) et (31). Ces variations ont suggéré l'hypothèse d'un inhibiteur physiologique de la rénine. Mais elles peuvent plus simplement s'expliquer par des variations de la concentration endogène du substrat.

Les études *cinétiques* de cette réaction n'ont pas apporté d'éclaircissements définitifs sur ce point, car elles divergent sur l'ordre de la réaction. Pour certains auteurs (3), (10), (17, 18) et (31), elle est d'ordre zéro car la vitesse de déroulement de la réaction est très élevée (proche du maximum), la concentration du substrat étant nettement supérieure à la K_m . D'autres comme Gould et coll. (15) et Skinner (42), sans contester le probable excès de substrat *in vivo*, n'ont pas vérifié une telle variation de la concentration du substrat *in vitro*, qui en étant proche de la K_m ferait conclure à une réaction d'ordre premier. Ils ont démontré que la vitesse de la réaction dépend également de la concentration de la rénine endogène. D'autres enfin présentent des résultats intermédiaires et contradictoires: cinétique d'ordre zéro au pH physiologique et d'ordre premier au pH optimum (12), (31) et (44).

Ces divergences dans les observations sur la cinétique de la réaction ont fait penser qu'un inhibiteur physiologique pourrait être présent dans le plasma. Cette hypothèse n'avait pas été vérifiée jusqu'à la découverte récente d'un lysophosphatide présent dans le plasma et le rein de plusieurs espèces qui a une action inhibitrice sur la réaction rénine-angiotensine, *in vitro* et *in vivo* chez le rat hypertendu (13). Les prostaglandines auraient un rôle analogue chez l'homme, non encore élucidé (23). Dans ce travail où les conditions de pH, de température, de durée d'incubation sont constantes et, où l'apport exogène de rénine homologue est en excès, les valeurs d'angiotensine générées pour les basses concentrations de substrat, montrent des écarts par rapport aux valeurs théoriques. Ce fait pourrait suggérer la présence d'un inhibiteur, conformément à l'hypothèse de Kotchen (23).

Le schéma expérimental simple que nous avons utilisé a permis d'obtenir une gamme de concentrations de substrat en variant, soit le volume total du milieu d'incubation, soit la quantité totale de substrat incubé. Comme nous l'avons vu, cette méthode ne permet pas de donner les caractéristiques fondamentales de la cinétique enzymatique (V_{max} , K_m) pour des raisons techniques, mais offre un moyen simple de vérifier la relation vitesse de réaction-concentration du substrat.

Dans ces conditions définies nous avons pu vérifier notre hypothèse de travail. Au-dessous de la valeur maximale d'angiotensine générable, la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration de substrat incubée (cinétique d'ordre premier), alors que lorsque la cinétique est d'ordre zéro, la vitesse ne dépend que de la quantité de rénine.

Conclusions

Nous avons illustré l'influence de la concentration du substrat et celle de la température sur la cinétique de la réaction rénine-angiotensine II, par un schéma simple.

La mesure de la concentration plasmatique du substrat de notre pool de plasma montre que:

- *en valeur absolue*, le substrat est en grande quantité dans le plasma humain, puisqu'il faut un très grand excès de rénine exogène pour épuiser le substrat endogène, *in vitro*, au cours d'une incubation de trois heures.
- les taux d'angiotensine produits dans ces circonstances, sont nettement supérieurs à *toutes les situations d'élévation de la rénine, in vivo, même les plus pathologiques* (HTA malignes).

Pour ces deux raisons, il faut admettre que le substrat ne constitue pas un facteur limitant de la réaction et que la relation entre le taux d'angiotensine produite et la quantité de rénine est bien linéaire (Haas et Goldblatt (18), Pickens (31) et Skeggs et coll. (39). Il faut déterminer la K_m et la vitesse max. d'un plasma pour savoir si l'on dose l'activité de la rénine ou la concentration de rénine.

Ces déterminations et celle de la concentration du substrat permettront de dissocier des populations de sujets à activité de rénine similaire mais à concentrations de substrat différentes et inversement, des individus présentant des ARP différentes et des concentrations de substrat proches. Cliniquement, ces études sont d'un grand intérêt, puisqu'en définitive nous ne possédons que peu d'information sur les facteurs contrôlant le taux du substrat, hormis l'effet marqué et rapide des oestrogènes sur la synthèse du substrat (grossesse et contraceptifs oraux).

References

- (1) Biron P, Campeau P. et David P.: Fate of Angiotensin-I and II on the human pulmonary circulation. *Amer. J. Cardiol.* 24:544, 1969.
- (2) Boucher R, Veyrat R., Champlain A de, Genest J: New procedure for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels. *Canad. med. Ass. J.* 90: 194-201, 1964.
- (3) Boyd GW, Fitz A.E, Adamson AR et Peart W.S.: Radioimmunoassay determination of plasma renin activity. *Lancet*, i, 213, 1969.
- (4) Brown JJ, Davies DL, Lever A.F, Robertson J.I.S et Tree M: The estimation of renin in human plasma. *Biochem. J.* 93: 594, 1964.
- (5) Bumpus F.M; Biochemical aspects of the renin angiotensin-system. *Trans. N.Y Acad. Sci.* 27: 445, 1965.
- (6) Carretero O, Gross F: Renin substrate in plasma under various experimental conditions, in the rat. *Amer. J. Physiol.* 213: 695-700, 1967.
- (7) Carretero O, Gross F: Evidence for humoral factors participating in the renin-substrate reaction. *Circulat. Res.* 20 et 21 suppl. 11: 115, 1967.
- (8) Cohen E.L, Grim C.E, Conn J.W, Blough W.M jun., Guyer R.B, Kem D.C, et Lucas C.P: Accurate and rapid measurement of plasma renin activity by radioimmunoassay. *J. Lab. clin. med.* 77: 1025, 1971.
- (9) Dahlheim H, Weber P et Rosenthal J: Vergleichende Reaktionskinetische Untersuchungen mit standardisiertem menschlichen Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten. *Pflügers Arch.* 317:344, 1970.
- (10) Devaux C, Meyer P, Idatte J.M et Milliez P: Influence of bilateral nephrectomy on renin-angiotensin system in man. *Nephron* 6:612, 1969.
- (11) Favre L, Roussel-Deruyck R et Vallotton M.B: Influence of pH on human renin activity with different substrates: role of substrate denaturation. *Biochem. Biophys. Acta* 273:1, 1973.
- (12) Favre L: Etude cinétique de la réaction enzymatique de la rénine humaine avec différents substrats. These N° 3327. Genève, 1973.
- (13) Fisher J.W: *Kidney hormones*. Academic Press, London, 1971.
- (14) Gould A.B, Skeggs L.T et Kahn J.R: Measurement of renin and substrate concentrations in human serum. *Lab. Invest.* 15:1802, 1966.
- (15) Gould A.B et Green D: Kinetics of human renin and human substrate reaction. *Cardiol. Res.* 5: 86, 1971.
- (16) Haas E, Lamfrom H. et Goldblatt H.: A simple method for the extraction and partial purification of the renin. *Arch. Biochem.* 42:368-386, 1953.
- (17) Haas E, Goldblatt H et Gibson E.C: The purification of human renin. *Arch. Biochem.* 110:534, 1965.
- (18) Haas E, Gould A.B et Goldblatt H: Estimation of endogenous renin in human blood. *Lancet*, i, 657, 1968.
- (19) Haber E: Recent developments in pathophysiologic studies of the renin-angiotensin system. *New Eng. J med.* Jan 16, 1969.
- (20) Haber E, Kroener T et Page L.B: Immunoassay for angiotensin in application to a determination of renin activity. *Circulation* 37 et 38, VI, 91, 1968.
- (21) Helmer O.M et Judson W.E: The quantitative determination of renin in the plasma of patients with arterial hypertension. *Circulation* 27:1050, 1963.
- (22) Kemp E. et Rubin I: Molecular weight of renin determined by Sephadex gel-filtration. *Acta. Chem. Scand.* 18:2403, 1964.
- (23) Kotchen T.A et Miller M.C: Evidence for the participation of cofactors in the renin reaction. International study for steroid hormones. VIth meeting of Endocrinolo-

- gy and hypertension. Rome 6-8.12.1973.
- (24) Lamfrom H, Haas E. et Goldblatt H: Studies on anti-renin. *Amer. J. Physiol.* 177:55, 1954.
 - (25) Lazar J, Romero J.C et Hoobler S.W: Renin kinetics in experimental renal hypertension. *Amer. J. Physiol.* 220:191, 1971.
 - (26) Lever A.F, Robertson J.I.s and Tree M: The estimation of renin by an enzyme kinetic technic. *Biochem. J.* 91:346, 1964.
 - (27) Ng K.K.F et Vane J.R: Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature.* 216:762, 1967.
 - (28) Ng K.K.F et Vane J.R: Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vitro. *Nature.* 225:1142, 1970.
 - (29) Oparil S, Tregear C.W, Koerner T, Barnes B.A et Haber C.: Mechanism of pulmonary conversion of angiotensin I to II, in the dog. *Circul. Res.* 29:682, 1971.
 - (30) Peart W.S, Lloyd A.M, Thachter G.N, Lever A.F, Payne N et Stone N: Purification of pig renin. *Biochem. J.* 99:708, 1966.
 - (31) Pickens P.T, Bumpus F.M, Lloyd A.M, Smeby R.R et Page L.H: Measurement of renin activity in human plasma. *Circulation. Res.* 17:438, 1965.
 - (32) Poulsen K: No evidence of active renin-inhibitor in plasma. The kinetics of the reaction between renin and substrate in non pre-treated plasma. *Scand. J. clin. Invest.* 27:37, 1971.
 - (33) Poulsen K: Kinetics of the renin-system. The basis for determination of the different components of the system. These from the University Institute for experimental medicine. University of Copenhagen, Denmark, 1973.
 - (34) Rosenthal H.P, Wolff P, Weber P et Dahlheim H: Enzyme kinetic studies in human renin and its purified homologous substrate. *Amer. J. Physiol.* 221, 5:1292, 1971.
 - (35) Rosset E et Veyrat R: Plasma renin activity and renin substrate in normal man. *Europ. J. clin. Invest.* 1,5:328, 1971.
 - (36) Rössler R, Horneff W, Klaus D, Simsch A: Bestimmung der Plasmareninaktivität durch radioimmunologischen Nachweis von Angiotensin I. *Klin. Wschr.* 49:870, 1970.
 - (37) Sanders G.E et Higgins C.G: Subcellular distribution of angiotensin I converting enzyme in rabbit lung. *Nature. Biol.* 230:27, 1971.
 - (38) Schaffenburg C.A, Haas E et Goldblatt H: Concentration of renin in kidney and angiotensinogene in serum in various species. *Amer. J. Physiol.* 199:788-792, 1960.
 - (39) Skeggs L.T, Kenneth E, Lentz K.E, Kahn J.R, Dorer F.E. Levine M: Pseudorenin, a new angiotensin-forming enzyme. *Curculation Res.* 25:451, 1969.
 - (40) Skeggs L.T, Lentz K.E, Hochstrasser H et Kahn J.R: The chemistry of renin substrate. *Canad. Med. Ass. J.* 90:185-189, 1964.
 - (41) Skeggs L.T, Lentz K.E, Kahn J.R et Hochstrasser H: Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic peptide substrates. *J. Exptl. Med.* 128:13, 1968.
 - (42) Skinner S.L: Improved assay methods for renin "concentration" and "activity" in human plasma. *Circulation. Res.* 20:391. 1967.
 - (43) Vane J.R: Sites of conversion of angiotensin I. In "Hypertension 1972 Ed. Genest J et Koiv E. Springer Verlag. Berlin. 1972.
 - (44) Waldhäusl W et Lewandoski J.A: Measurement of plasma renin concentration (PRC) using exogenous substrate and radioimmunoassay. *Europ. J. clin. Invest.* 3:1-9, 1973.

